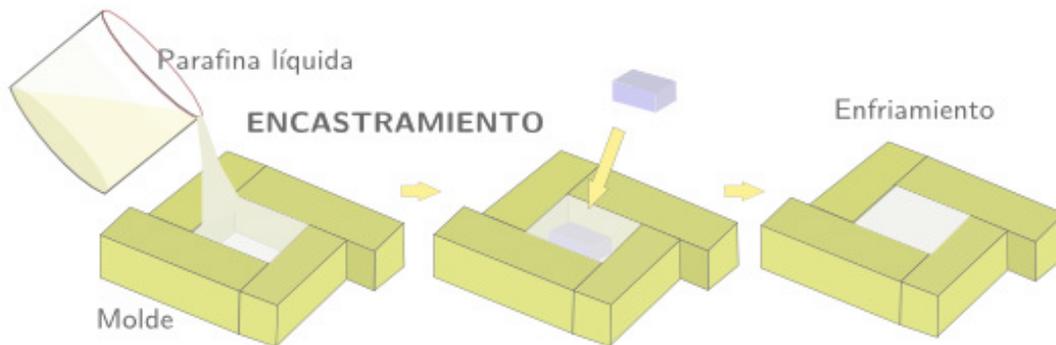


Técnicas histológicas

INCLUSIÓN



Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.
Fcaultad de Biología. Universidad de Vigo.

(Versión: Julio 2024)

Este documento es una edición en pdf del sitio
<http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.

Todo el contenido de este documento se distribuye bajo
la licencia Creative Commons del tipo BY-NC-SA
(Esta licencia permite modificar, ampliar, distribuir y usar
sin restricción siempre que no se use para fines comerciales,
que el resultado tenga la misma licencia y que se nombre
a los autores)

La edición de este documento se ha realizado con el software \LaTeX
(<http://www.latex-project.org/>), usando Texstudio
(www.texstudio.org/) como editor.

Contenidos

1	Introducción	1
2	El proceso histológico	2
3	Inclusión	4
4	Inclusión en parafina	6
5	Inclusión en resina	8

1 Introducción

En estas páginas dedicadas a las técnicas histológicas vamos a describir los procedimientos experimentales necesarios para obtener secciones teñidas y listas para observar al microscopio partiendo de tejidos vivos extraídos de un animal o de una planta. Por tanto, dedicaremos espacios a la obtención, fijación, inclusión, corte, tinción y observación de los tejidos. Todos estos apartados seguirán el mismo esquema que los capítulos dedicados a los tejidos o a la célula, partir de un esquema básico y ampliar la información sucesivamente en páginas adicionales. No dedicaremos demasiado espacio a los instrumentos desde el punto de vista operativo, pero sí a la conveniencia de su uso y a sus capacidades. Además, se incluye un apartado de protocolos y recetas donde se incorporan los tiempos, productos y manera de proceder para llevar a cabo las tinciones más comunes y cómo preparar sus reactivos. También se han añadido algunos vídeos explicativos

La mayoría de las técnicas histológicas van encaminadas a preparar el tejido para su observación con el microscopio, bien sea éste óptico o electrónico. Ello es debido a dos razones: a) que la composición de los tejidos, salvo contadas ocasiones, no tienen contraste ni colores que permitan diferenciar sus estructuras de una manera clara y b) que la mayoría de las estructuras tisulares y celulares no se pueden discriminar a simple vista sino con la ayuda de los microscopios. Por ello hay que procesar las muestras, primero para que no se deterioren y después para resaltar sus estructuras y poder estudiarlas en detalle.

Existen procedimientos rápidos y simples para la observación de tejidos y células vivas que reciben el nombre de vitales. Los intravitales permiten la observación dentro del cuerpo. Por ejemplo, la observación del flujo sanguíneo en capilares del sistema circulatorio. Otra forma de observar células o tejidos vivos es mediante las técnicas histológicas supravitales, en las

que las células y los tejidos se mantienen o se hacen crecer fuera del organismo, como es el caso de los cultivos de células y de tejidos *in vitro*.

Las técnicas histológicas postvitales son aquellas en las que las células mueren durante el proceso, pero las características morfológicas y moleculares que poseían en estado vivo se conservan lo mejor posible, lo que depende del tipo de técnica empleada. Estas páginas estarán dedicadas a este tipo de técnicas, puesto que son las más comúnmente usadas en los laboratorios de histología.

El objetivo de toda técnica histológica es observar y estudiar la estructura general o detallada de los diferentes componentes tisulares. Estas características observadas deberían ser iguales a las que poseían los tejidos en su estado vivo. Aunque las técnicas histológicas actuales están diseñadas para disminuir al máximo las alteraciones de las características de los tejidos durante su aplicación, todas las técnicas introducen modificaciones más o menos importantes que pueden afectar de manera diferencial a diferentes componentes tisulares. Estas alteraciones se llaman artefactos y tenemos que tenerlos en cuenta a la hora de interpretar lo que observamos en el microscopio.

A lo largo de la historia de la ciencia se ha puesto a punto una gran variedad de técnicas histológicas. Algunas de ellas son generales y se utilizan para una evaluación global de las muestras, mientras que otras son más específicas y permiten la identificación y estudio de estructuras determinadas. Algo a tener en cuenta es que la selección de la técnica y sus variantes depende básicamente del tejido que queramos observar y de lo que queramos estudiar en él. Por ejemplo, no es lo mismo estudiar un tejido animal que uno vegetal, o trabajar con tejido óseo que con tejido nervioso. En las siguientes páginas vamos a presentar las técnicas más generales usadas comúnmente en los laboratorios de histología.

2 El proceso histológico

Denominamos proceso histológico a una serie de métodos y técnicas utilizados para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. Hay diversos caminos para estudiar los tejidos, es decir, diversas series de técnicas que se utilizarán dependiendo de qué característica deseemos observar. En el siguiente esquema (Figura 1) se muestran los métodos y técnicas comúnmente empleados durante el procesamiento de los tejidos para su observación con los microscopios óptico o electrónico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen muchas variantes a estos "caminos" y su elección dependerá del resultado final que queramos obtener.

El proceso histológico comienza con la obtención del tejido objeto de estudio. En el caso de los tejidos vegetales directamente se toman muestras de los distintos órganos que componen el cuerpo de la planta, mientras que para los tejidos animales podemos optar por dos opciones: coger una porción del tejido u órgano y procesarla o procesar primero el animal completo y luego extraer la muestra que nos interese. En cualquier caso las muestras son habitualmente fijadas. Fijar un tejido es como hacer una fotografía de dicho tejido, se lleva a cabo para mantener las estructuras celulares y moleculares inalterables durante el procesamiento posterior y con una organización lo más parecida posible a como se encontraban en la muestra viva. La fijación más habitual se lleva a cabo con unas soluciones líquidas denominadas fijadores. También podemos fijar las moléculas de los tejidos por congelación rápida. La fijación por congelación se emplea cuando la fijación química o los procesos histológicos posteriores alteran las características de la muestra que queremos estudiar, por ejemplo una molécula sensible a dichos tratamientos.

Tras la fijación es habitual incluir el tejido para posteriormente obtener secciones. Cuanto más delgada queramos que sea nuestra sección más tendremos que endurecer nuestra muestra. Esto se consigue embebiendo el tejido con sustancias líquidas que posteriormente polimerizarán (resinas) o se volverán consistentes (ceras). También se puede conseguir el mismo efecto mediante congelación rápida. Cortes

más gruesos de 40 μm se pueden cortar sin necesidad de inclusión usando el vibratomo o microtomos de congelación. Los medios de inclusión no son normalmente hidrosolubles por lo que tendremos que sustituir el agua de los tejidos por solventes orgánicos liposolubles y posteriormente sustituirlos por el medio de inclusión.

Para el caso de algunas muestras es necesario hacer un tratamiento previo a la fijación. Por ejemplo, el tejido óseo contiene minerales que dificultan su procesamiento. En este caso se suele someter a un proceso de descalcificación, tras el cual se prosigue con la inclusión de las muestras.

Tras la inclusión o la congelación se procede a cortar los tejidos, es decir, obtener secciones. Existen diferentes aparatos de corte que permiten conseguir secciones de distinto grosor: ultrafinas (del orden de nm), semifinas (de 0.5 a 2 μm), finas (entre unas 3 y 10 μm) y gruesas (mayores a 10 μm). Habitualmente las secciones se procesan para poder observarlas y estudiarlas, aunque ciertos tipos de microscopía, por ejemplo con contraste de fase, permiten observar secciones de tejidos sin procesar. Normalmente las secciones se tiñen con colorantes que son hidrosolubles, por lo que hay que eliminar el medio de inclusión para que los colorantes pueden unirse al tejido. Las secciones ultrafinas (observadas con el microscopio electrónico) o semifinas (observadas con el microscopio óptico) se pueden contrastar con metales pesados o con colorantes, respectivamente, sin necesidad de eliminar el medio de inclusión. Las secciones obtenidas a partir de muestras congeladas se puede procesar u observar una vez llevadas a temperatura ambiente.

Los tejidos procesados se observan con los microscopios. Existen dos tipos básicos de microscopios: óptico y electrónico. Los primeros ofrecen una gran versatilidad en cuanto a modos de observar los tejidos: campo claro, contraste de fase, polarización o contraste de interferencia diferencial, mientras que los segundos permiten un gran poder de resolución, pudiéndose observar características ultraestructurales como membranas celulares o incluso complejos moleculares.

Como dijimos al comienzo existen múltiples varia-

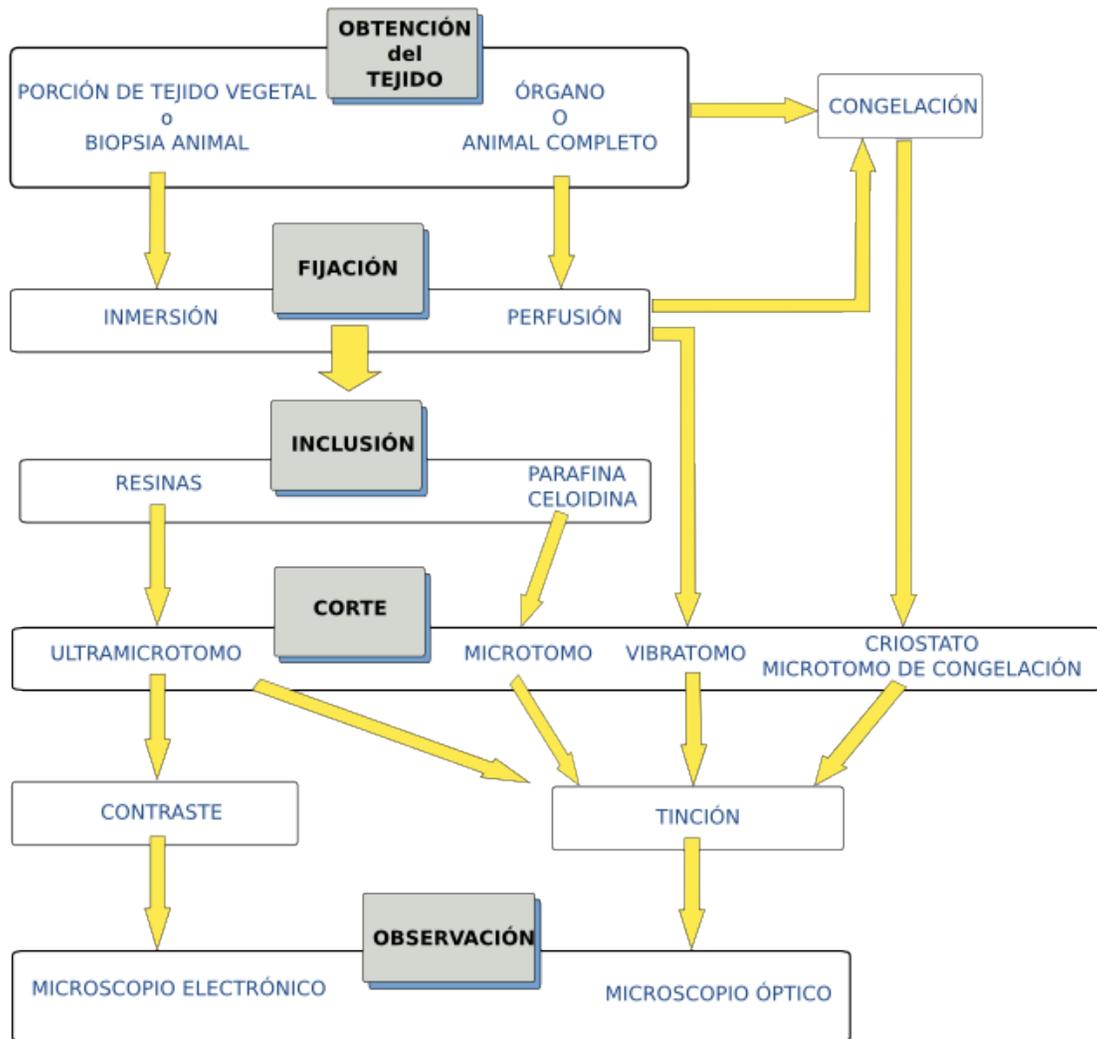


Figura 1: Esquema del proceso histológico.

ciones sobre este esquema general de procesamiento histológico. Por ejemplo, se pueden observar tejidos con el microscopio electrónico de barrido sin necesidad de incluir ni cortar, pero sólo observaremos superficies. Si queremos cuantificar nuestros resultados, por ejemplo, número de células de una estructura, tendremos que hacer un muestreo sistemático y aleatorio de la muestra, según los principios de la estereología.

Ello requerirá unas condiciones previas para que cada célula tenga la misma probabilidad de ser observada. De igual modo, si queremos observar muestras gruesas o muy gruesas puede ser buena idea someter a esas muestras a un proceso de aclarado antes de su observación. En las siguientes páginas veremos con cierto detalle algunas de las técnicas más empleadas para la observación de los tejidos.

3 Inclusión

Una vez fijado el tejido tenemos que procesarlo para su observación con el microscopio. Ello implica hacer secciones para teñirlas primero y posteriormente observarlas. Normalmente se procede al endurecimiento de la muestra para poder obtener dichas secciones. La regla general es que cuanto más delgada queramos una sección más consistente debe ser la muestra de la que se obtiene. Los tejidos se endurecen a consecuencia de la fijación, pero esta dureza no es muy alta e impide la obtención de cortes generalmente más delgados que 20 o 30 μm . Sólo en el caso de que queramos trabajar con secciones relativamente gruesas (entre 30 y 200 μm) se puede aprovechar el endurecimiento provocado por el fijador y obtener dichas secciones con el vibratomo. Este tipo de aparato se utiliza en ciertas técnicas donde es necesaria una buena preservación molecular. Sin embargo, en muchos casos necesitamos endurecer más el tejido para obtener secciones más finas, lo cual se puede hacer de dos formas: por congelación o por inclusión (Figura 2).

La congelación de los tejidos previamente fijados permite la obtención de secciones que pueden ir desde unas 50 μm hasta decenas de nm de grosor, para lo que se utilizan diferentes aparatos: microtomo de congelación para secciones de decenas de μm , criostato para secciones de entre 5 y 20 μm y ultracriostato para secciones ultrafinas del orden de nm. Para evitar los daños que se producen durante los procesos de congelación, como la formación de cristales de hielo que nos agujerean los tejidos, se pueden usar diversas soluciones. a) Anticongelantes que impidan la formación de cristales, siendo el crioprotector más usado la sacarosa al 30 %, aunque también se usa el dimetil sulfóxido, el glicerol, etilén glicol y otros. La elección de uno u otro depende del tipo de muestra y de la técnica

que se vaya a usar. b) Una congelación lo más rápida posible, por ejemplo, con nitrógeno líquido. Cuanto más rápida es la congelación menores son las dimensiones de los cristales de agua formados, y menores los daños en el tejido. En la práctica, las observaciones a microscopía electrónica requieren de ambos: anticongelantes y congelación muy rápida.

La inclusión es el método más común de endurecer el tejido y consiste en infiltrar la muestra con sustancias líquidas que tras un proceso de polimerización o enfriamiento se solidifican, sin afectar a las características del tejido. Este procedimiento se introdujo a mediados del siglo XIX. Con ello se consigue obtener cortes del orden de μm a nm, según el medio de inclusión, sin que el tejido se rompa o se deteriore. Además, son un buen método para preservar las muestras durante largos periodos de tiempo. Existen diferentes sustancias o medios de inclusión dependiendo del grosor del corte y de la técnica que necesitemos realizar. Cuando se quieren hacer secciones para su observación con el microscopio óptico el medio de inclusión más frecuentemente usado es la parafina, mientras que si vamos a realizar observaciones con el microscopio electrónico la inclusión se realiza con resinas, principalmente de tipo acrílicas o epoxy. Hay otros medios de inclusión que se usan cuando al técnica lo requiere como son la celoidina, nitrocelulosa, polietilén glicol o poliésteres de ceras.

La mayoría de estas sustancias no son hidrosolubles, es decir, no son miscibles con el agua, luego si queremos que la sustancia en la que vamos a incluir ocupe todo el tejido tenemos que eliminar el agua y sustituirla por un líquido miscible con dicha sustancia. Si una muestra no está completamente embebida en el medio de inclusión se deteriorará y la obtención de secciones homogéneas será imposible.

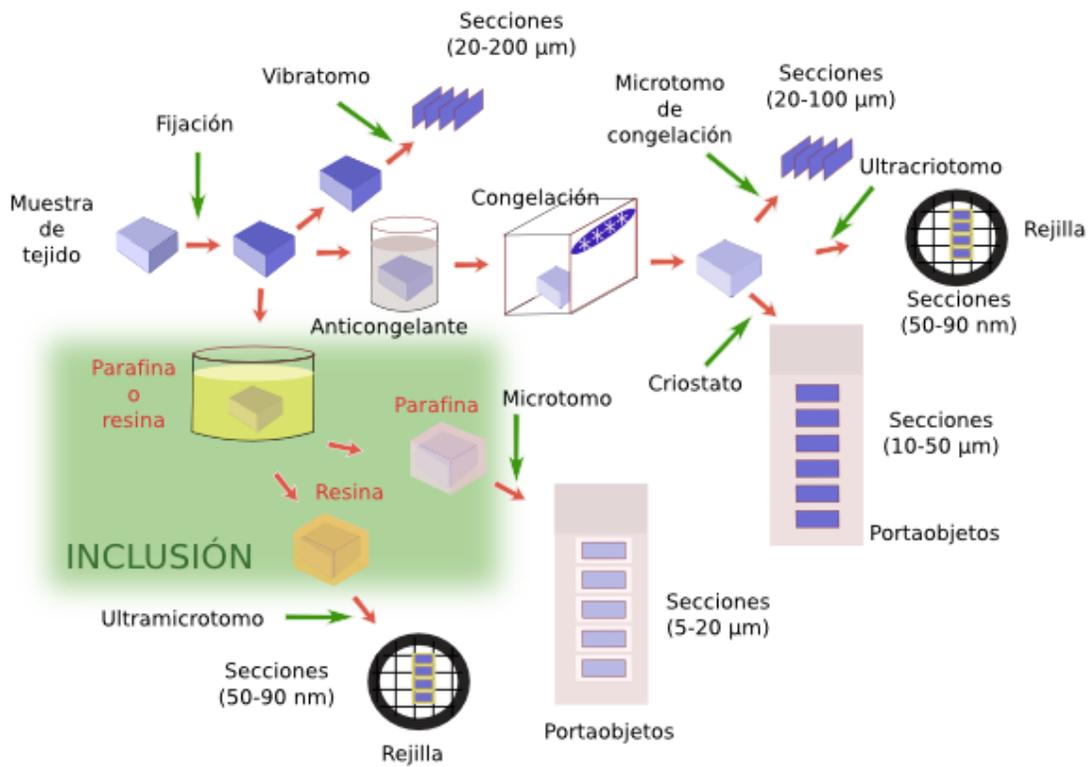


Figura 2: Esquema de la inclusión en parafina de una muestra de tejido previamente fijada. Los tiempos de incubación en cada paso pueden variar en función del tamaño de la muestra, tipo de tejido o, por ejemplo, el tipo de líquido intermediario. Sin embargo, los pasos son comunes a cualquier inclusión en parafina.

4 Inclusión en parafina

Para la inclusión de muestras que han de observarse con el microscopio óptico se utiliza sobre todo la parafina, y en menor medida la celoidina, como medio de inclusión. Vamos a describir los pasos para la inclusión en parafina de muestras de tejido previamente fijadas.

La parafina es una sustancia de aspecto ceroso que está formada por mezclas de hidrocarburos saturados. A temperatura ambiente es sólida y su punto de fusión puede variar entre 40 °C y 70 °C según la composición de la mezcla de hidrocarburos. Así, parafinas más duras a temperatura ambiente tienen un punto de fusión mayor, mientras que las más blandas uno menor. Es recomendable una dureza mayor para incluir muestras más duras. Las parafinas más usadas tienen un punto de fusión en torno a los 60 °C. Podemos también modificar las características de las parafinas añadiendo sustancias para variar su dureza, viscosidad, fragilidad, etcétera.

La parafina no es miscible con agua, mientras que todos los tejidos están formados principalmente por agua. Además, la mayoría de los fijadores son soluciones acuosas. Esto implica que para que la parafina líquida pueda penetrar completamente en el tejido ha de sustituirse el agua por un solvente orgánico, lo que se consigue mediante la deshidratación del tejido en alcoholes, normalmente etanol, de gradación creciente hasta alcohol de 100°. La deshidratación debe ser completa porque de no ser así afectará a la infiltración posterior de la parafina. Además, ha de ser lenta y gradual para evitar retracciones del tejido. Si se deshidrata demasiado las muestras se vuelven quebradizas, mientras que una deshidratación insuficiente impide que los agentes aclarantes y el medio de inclusión penetren bien en los tejidos. La deshidratación se puede hacer también en etanol-acetona, metanol, isopropil alcohol, butanol, glicol y alcoholes desnaturalizados. Durante la deshidratación se pueden introducir aditivos tales como el fenol, que actúa como un agente que reblandece las muestras tales como los tendones o las uñas y masas densas de queratina. Se usa al 4 % en el etanol de 96 %.

Posteriormente se transfiere el tejido a un líquido que es miscible tanto con el alcohol de 100° como con la parafina, denominado sustancia intermediaria, como es el benceno, xileno, tolueno o el óxido de propileno, entre otros. Estas sustancias son normalmente aclarantes por lo que comprobando la translucidez de la pieza podemos cerciorarnos de la penetración de la sustancia intermediaria en el tejido. El tiempo de incubación de la pieza en algunos de estos líquidos intermediarios como el tolueno o xileno no debe ser excesivo puesto que estas sustancias endurecen la pieza y crean problemas al hacer las secciones.

Por último se pasa el tejido a parafina previamente licuada en una estufa regulada a la temperatura apropiada para dicho tipo de parafina. Se suelen hacer incubaciones sucesivas en parafina líquida para favorecer una completa sustitución del líquido intermediario por la parafina. El tiempo que dura dichos pasos depende de lo volátil que sea el líquido intermediario y lo grande que sea nuestra pieza. Será mayor cuanto menos volátil es el líquido intermediario o mayor sea la muestra de tejido. Hay que tener en cuenta que un tiempo excesivo en parafina puede endurecer el tejido. Sin embargo, los efectos de una pobre infiltración pueden ser más perjudiciales que mantener mucho tiempo las muestras en parafina líquida. Tras la infiltración completa de la muestra se vierte parafina líquida en un molde, se introduce la muestra y se coloca según la orientación deseada de corte y se deja solidificar a temperatura ambiente.

Un protocolo común de inclusión en parafina es el siguiente (Figura 3):

La inclusión en celoidina se emplea menos actualmente. La celoidina se disuelve en partes iguales de alcohol absoluto y éter. A esta solución se transfieren las muestras desde el etanol absoluto. A medida que se evaporan el alcohol y el éter se hace más densa la celoidina. Finalmente se endurece con cloroformo y se mantienen en 80 % de etanol. El proceso de inclusión es más largo que el de parafina pero las muestras se endurecen más y provoca menos retracción y deterioro.

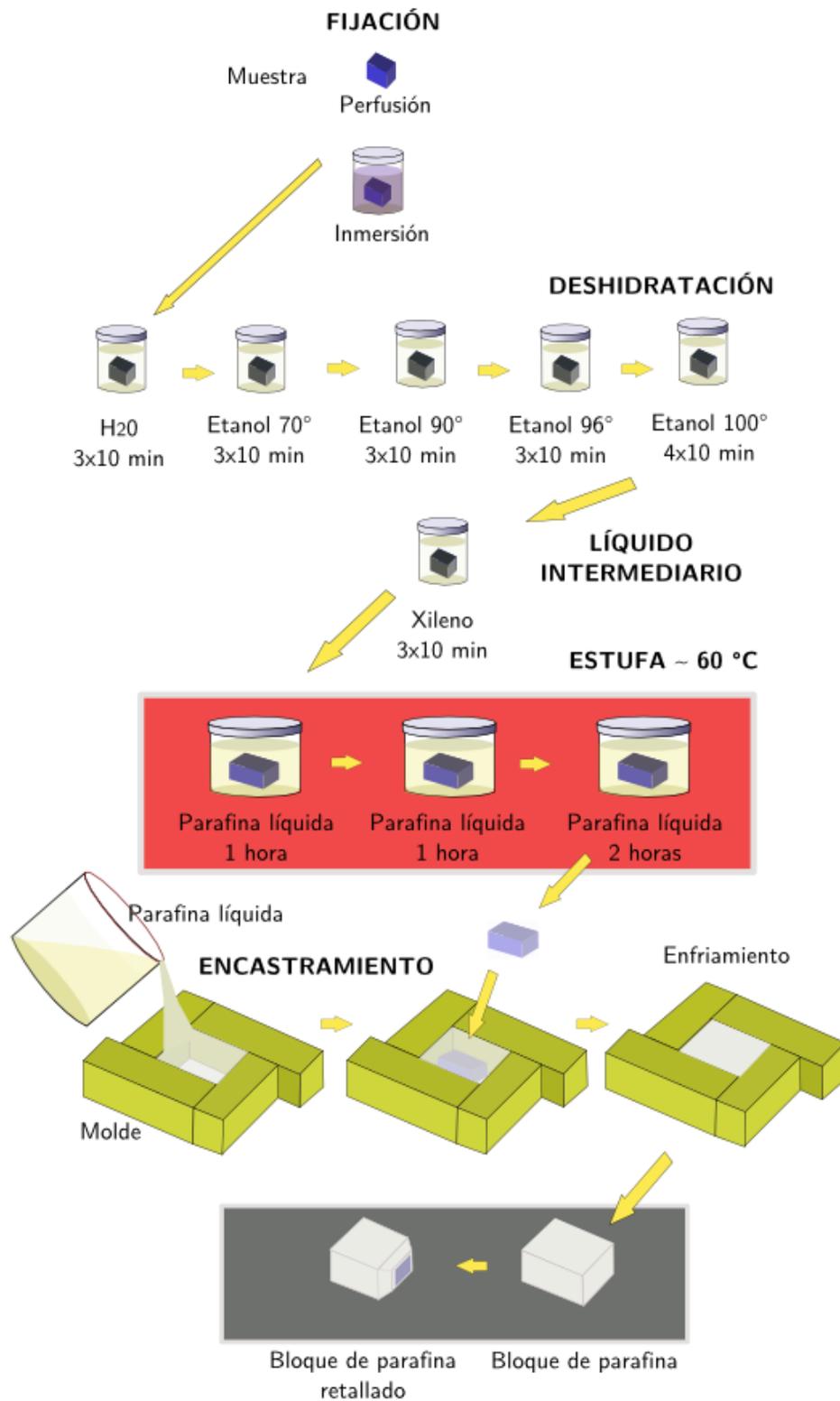


Figura 3: Esquema de la inclusión en parafina de una muestra de tejido previamente fijada. Los tiempos de incubación en cada paso pueden variar en función del tamaño de la muestra, tipo de tejido o, por ejemplo, el tipo de líquido intermediario. Sin embargo, los pasos son comunes a cualquier inclusión en parafina.

5 Inclusión en resina

Para la observación de la ultraestructura celular es necesario hacer secciones de tejido muy delgadas, del orden de nanómetros, denominadas ultrafinas, y usar un microscopio electrónico de transmisión para su observación. La obtención de secciones ultrafinas implica que tenemos que endurecer enormemente el tejido. Esto se puede conseguir mediante congelación, obteniendo entonces las secciones con un ultracriotomo. Sin embargo, lo más frecuente es incluir el tejido en un material de alta dureza como son las resinas de tipo epoxy, o en menor medida las resinas acrílicas como el metacrilato. Ambas se infiltran en el tejido en forma líquida y posteriormente polimerizan sin afectar a la ultraestructura celular.

El procedimiento estándar de inclusión en resinas tipo epoxy es similar al descrito para la inclusión en parafina con algunas modificaciones. Así, los pasos que se siguen son fijación de las muestras por inmersión o perfusión, deshidratación, líquido intermediario, infiltración y polimerización en el medio de inclusión. Algunos medios de inclusión de tipo acrílico, por ejemplo la resina LR White, son parcialmente miscibles con el agua por lo que no es necesario deshidratar completamente la muestra ni emplear el líquido intermediario. La polimerización de las resinas epoxy es por calor a 60 °C, mientras que otras como el metacrilato es con luz ultravioleta a bajas temperaturas. Las resinas acrílicas son buenas para estudios citoquímicos.

En las inclusiones en resinas tipo epoxy, normalmente para muestras que se observarán en el microscopio electrónico, se suelen tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

a) Las soluciones fijadoras suelen contener glutaraldehído y es necesaria una postfijación posterior en tetróxido de osmio. Con ello nos aseguramos una fuerte fijación para preservar la ultraestructura celular y que no perderemos los lípidos que forman las membranas celulares durante el proceso de inclusión, gracias al tetróxido de osmio.

b) Partimos de tamaños de muestras mucho más pequeñas, de unos pocos milímetros, puesto que no

nos interesa ver la organización general del tejido sino detalles del mismo. Si queremos observar zonas diferentes de un órgano es conveniente hacer bloques de muestra pequeños e independientes de cada una de ellas.

c) Las resinas más comúnmente usadas para la inclusión no son hidrosolubles, por lo que tenemos que sustituir el agua del tejido por un solvente orgánico que sea miscible con la resina. Para ello se deshidrata el tejido mediante incubaciones sucesivas en gradaciones crecientes de etanol o acetona. Como líquido intermediario entre la acetona pura o el etanol de 100° y las resinas se suele utilizar el óxido de propileno.

d) El endurecimiento del medio de inclusión, la resina, no es por enfriamiento sino por polimerización, normalmente a 60 °C.

e) Al medio de inclusión, la resina, se le añaden aceleradores y plastificantes que regulan las características de la polimerización y la dureza de la resina polimerizada. Las resinas tipo epoxy son las más usadas puesto que aportan una mayor homogeneidad en la polimerización y más facilidad a la hora de obtener secciones regulares. Por el contrario las resinas acrílicas presentan algunos inconvenientes y hay que ser muy cuidadosos a la hora de elegir las condiciones de polimerización, obtención y tratamiento de los cortes ultrafinos.

A continuación se muestra un proceso de inclusión habitual en resinas de tipo epoxy (Figura 4).

La muestra infiltrada por la resina líquida, antes de la polimerización, se coloca en moldes de polimerización (Figura 5).

Tras la polimerización la resina se ha vuelto lo suficientemente dura como para poder cortarla en un ultramicrotomo a un grosor del orden de nanómetros. En la figura 6 se muestran bloques de resina polimerizada con material incluido, y láminas de resina polimerizada con muestras incluidas. La ventaja de las láminas es que se puede seleccionar la zona de tejido a cortar y si es suficientemente fina la muestra, por ejemplo un corte de menos de 100 µm de grosor, se puede observar primero al microscopio óptico y luego cortar esa zona para microscopía electrónica.

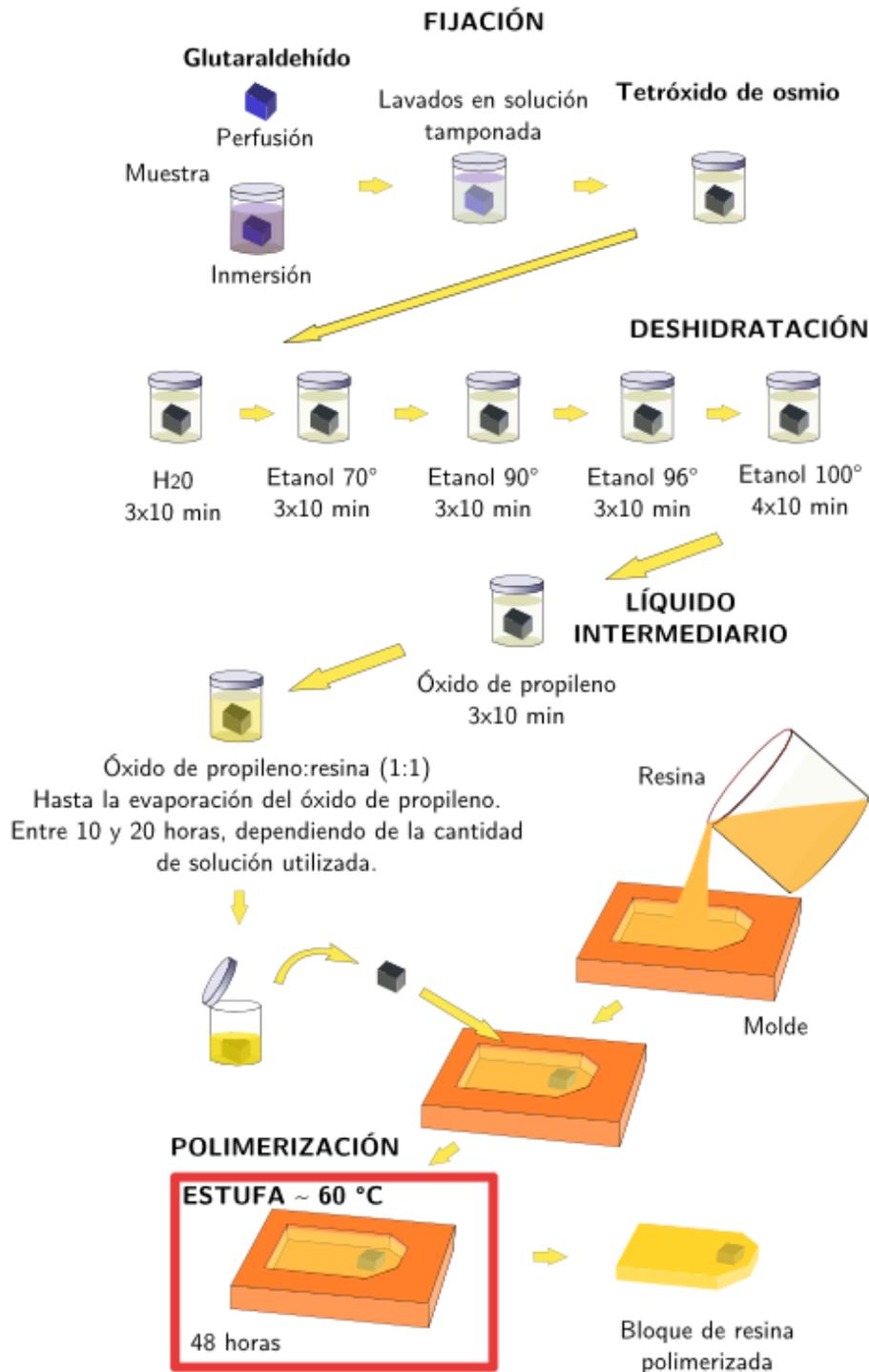


Figura 4: Esquema de la inclusión en resina de tipo epoxy de una muestra de tejido previamente fijada. Los tiempos de incubación en cada sustancia pueden variar en función del tamaño de la muestra o tipo de tejido.

Con las inclusiones en resina, además de ultrafinos, se pueden conseguir secciones semifinas, 0.5 - 1 μ m.

Esto permite cortar a una célula en varias secciones y se ha utilizado para estudios de localización de más de

una molécula en una misma célula, o co-localización. Se pueden estudiar tantas moléculas como secciones resulten de una célula. Para ello es necesario primero eliminar la resina. En el caso de las resinas epoxy se elimina con hidróxido sódico y metanol (metóxido de sodio) muy concentrado. En el caso de las resinas acrílicas se pueden eliminar con un solvente orgánico como el xileno. En ambos casos, una vez eliminada la resina se pueden procesar cada uno de los cortes, por ejemplo, para inmunocitoquímica, y ver qué transmisores expresa una determinada neurona.

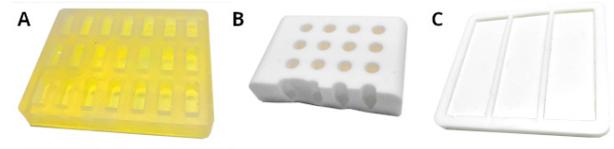


Figura 5: Moldes de polimerización donde se coloca la resina antes de introducirlos en la estufa para la polimerización. A y B forman bloques prismáticos y cilíndricos, respectivamente, mientras las inclusiones en plano se pueden hacer con los moldes que aparecen en la figura C.



Figura 6: Muestras incluidas en resina polimerizada. A: Bloques de resina. B: Láminas de resina. La de la derecha es suficientemente fina como para estudiarse con el microscopio óptico previamente a su procesamiento para microscopía electrónica.